

PCT/JP 2004/004190

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

25. 3. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 3 月 2 6 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 8 5 6 6 6
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 0 8 5 6 6 6]

出 願 人 株式会社ファルマデザイン
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 21 MAY 2004

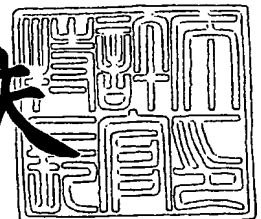
WIPO

PCT

2 0 0 4 年 4 月 2 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 3 6 6 6 4

【書類名】 特許願

【整理番号】 P03-0030

【提出日】 平成15年 3月26日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 38/17

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区八丁堀 4 - 2 - 1 0 第二後関ビル 株式会社ファルマデザイン内

【氏名】 原 高峰

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町 6 5 名古屋大学大学院医学系研究科 細胞生物物理学教室内

【氏名】 曾我部 正博

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区八丁堀 4 - 2 - 1 0 第二後関ビル 株式会社ファルマデザイン内

【氏名】 古谷 利夫

【特許出願人】

【識別番号】 500386563

【氏名又は名称】 株式会社ファルマデザイン

【代理人】

【識別番号】 100092783

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 浩

【電話番号】 03-3273-2611

【選任した代理人】

【識別番号】 100095360

【弁理士】

【氏名又は名称】 片山 英二

【選任した代理人】

【識別番号】 100093676

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 純子

【選任した代理人】

【識別番号】 100116850

【弁理士】

【氏名又は名称】 廣瀬 隆行

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 157061

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0201166

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 イオンチャネルの活性を阻害する低分子ペプチド

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩。

【請求項 2】 配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 3 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩。

【請求項 3】 配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 3 で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列からなるものではなく、かつ機械刺激感受性チャネル阻害活性を有するポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩。

【請求項 4】 請求項 1 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。

【請求項 5】 請求項 4 に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項 6】 請求項 5 に記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。

【請求項 7】 請求項 1 ～請求項 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩のうちいずれか 1 つ以上を含有する機械刺激感受性チャネル阻害剤。

【請求項 8】 請求項 1 ～請求項 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩のうちいずれか 1 つ以上を含有する心房細動の治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は、機械刺激感受性チャネル阻害活性を有するポリペプチド、このポリペプチドを含む機械刺激感受性チャネル阻害剤および心房細動の治療剤などに関するものである。より詳しくは、本発明は、クモ毒由来の天然ペプチド（GsMTx-4）の配列をベースにして機械刺激感受性チャネルに作用するファーマコフォアを特定し、そのファーマコフォアを構成するようにデザインされ、かつ

心房細動の治療に有用な新規ポリペプチドなどに関する。

【0002】

【従来の技術】

心房細動は、不整脈の一種であり、加齢とともにその有病率は高くなる。心房細動は、高齢者（65歳以上）の約3%に認められる心臓疾患である。心房細動が慢性化すると血栓を形成し、脳塞栓症を引き起こすため、現在では心房細動が重症脳卒中患者の主要な原因疾患と考えられている。このように心房細動は、脳梗塞などの合併症の発生頻度と重症度を考慮し、近年致死性不整脈のひとつとして認識されるようになった（J. Nippon. Med. Sch. 2002, 69(3)）。これまでに心房細動を根治するような治療薬は得られておらず、心房細動、特に慢性心房細動に対する薬物療法には限界があると考えられていた（同前）。

【0003】

心房細動は、心筋に存在するイオンチャネルの働きの異常が原因のひとつと考えられている。一方、クモ毒由来の天然ペプチド（GsMTx-4：配列番号4）が、機械刺激感受性チャネル（Stretch-Activated Channel: SAC）の活性を阻害することが知られている（例えば、Thomas M. Suchyna et. al., Identification of a Peptide Toxin from Grammostola Spatulata Spider Venom that Blocks Cation-selective Stretch-activated Channels, J. Gen. Physiol., Vol. 115, pp583-598, 2000（非特許文献1）参照）。また、同文献には、陸上及び水中の動物由来の毒液由来の毒素を構成するペプチドには、6つのシステインを含むICK（Inhibitor Cysteine Knot：インヒビターシステインノット）モチーフが共通して見出されることが記載されている（非特許文献1の590頁右欄下から7行目～下から3行目、および図30）。また、同文献には、GsMTx-4が、3つのシステインペア（C₁-C₄、C₂-C₅及びC₃-C₆）によって定義される基本構造を有するICK（Inhibitor Cysteine Knot）コンセンサスシステインモチーフを有することが示唆されている（非特許文献1の595頁左欄7行目から下から11行目、「GsMTx-4の構造」の欄）。

【0004】

また、GsMTx-4を抽出・精製等する方法や、そのGsMTx-4を用い

て心臓不整脈を治療する方法などが提案されている（例えば、Bode et al, nature, Vol. 409, pp35-36, 2001. (非特許文献2)、米国特許出願公開第2002/0077286号明細書（特許文献1）参照。）。また、GsMTx-4の構造は、NMRを用いた溶液中での結果が知られている（Robert et.al, J. Biol. Chem. Vol37, pp3443-34450, 2002. (非特許文献3) 参照。）このような知見にかかわらず、クモ毒由来のペプチド（GsMTx-4）を用いた心房細動の治療剤は開発されていなかった。

【0005】

【特許文献1】

米国特許出願公開第2002/0077286号明細書

【非特許文献1】

Thomas M. Suchyna et. al., Identification of a Peptide Toxin from Gram mostola Spatulata Spider Venom that Blocks Cation-selective Stretch-activated Channels, J. Gen. Physiol., Vol. 115, pp583-598, 2000

【非特許文献2】

Bode et al, nature, Vol. 409, pp35-36, 2001.

【非特許文献3】

Robert et.al, J. Biol. Chem. Vol37, pp3443-34450, 2002.

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明では、GsMTx-4のファーマコフォア（活性に必要最低限の空間構造）を同定し、ファーマコフォア情報に基づいて機械刺激感受性チャネルの活性を特異的に阻害する新規ポリペプチドを設計し、このようなポリペプチドを含む心房細動の治療剤などを提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

上記課題は、以下の発明により解決される。

(1) 本発明の第1の実施態様に係る発明は、「配列番号1、配列番号2、または配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、または当該ポリ

ペプチドの塩」である。これらのポリペプチドは、本明細書の実施例で確認されたとおり、機械刺激感受性チャネル阻害活性を有するポリペプチドであり、G s M T x - 4 のファーマコフォアを構成するポリペプチドであると考えられる。これらのポリペプチドは、心房細動の治療などに有用である。

(2) 本発明の第2の実施態様に係る発明は、「配列番号1、配列番号2、または配列番号3で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩」である。

(3) 本発明の第3の実施態様に係る発明は、「配列番号1、配列番号2、または配列番号3で表されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、配列番号4に記載のアミノ酸配列からなるものではなく、かつ機械刺激感受性チャネル阻害活性を有するポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩」である。

(4) 本発明の第4の実施態様に係る発明は、「上記(1)に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド」である。

(5) 本発明の第5の実施態様に係る発明は、「上記(4)に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター」である。

(6) 本発明の第6の実施態様に係る発明は、「上記(5)に記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体」である。

(7) 本発明の第7の実施態様に係る発明は、「上記(1)～上記(3)のいずれか1項に記載のポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩のうちいずれか1つ以上を含有する機械刺激感受性チャネル阻害剤)である。この阻害剤は、機械刺激感受性チャネルの活性を特異的に阻害するので、機械刺激感受性チャネルの研究などに有効に用いられる。

(8) 本発明の第8の実施態様に係る発明は、「上記(1)～上記(3)のいずれか1項に記載のポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩のうちいずれか1つ以上を含有する心房細動の治療剤」である。これらのポリペプチドは、本明細書の実施例で、その機能が確認されたとおり、機械刺激感受性チャネル阻害活性を有する。したがって、この治療剤は、心房細動の治療に有効に用いることができる。

【0008】

【発明の実施の形態】

(本発明のポリペプチド)

本発明のポリペプチドは、配列番号1、配列番号2、または配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、配列番号1、配列番号2、または配列番号3で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、配列番号1、配列番号2、または配列番号3で表されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、配列番号4に記載のアミノ酸配列からなるものではなく、かつ機械刺激感受性チャネル阻害活性を有するポリペプチド（すなわち、本発明の第1～第3の実施態様に係る発明に関するポリペプチド）である。

【0009】

また、本発明のペプチドは、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）などであってもよい。

本発明のペプチドには、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているものも含まれる。本発明のペプチドには、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したものも含まれる。本発明のペプチドには、側鎖上の置換基が、適当な保護基で保護されているものも含まれる。本発明のペプチドには、糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドも含まれる。

【0010】

本発明のペプチドの塩における「塩」としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、好ましくは生理学的に許容される酸付加塩である。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが挙げられる。

【0011】

(本発明のポリペプチドの合成)

本発明のポリペプチドは、化学的に合成してもよいし、組換えDNA技術を用いて製造してもよい。本発明のポリペプチドを化学的に合成するためには、公知の方法に従って合成すればよく、例えば、アジド法、酸クロライド法、酸無水物法、混酸無水物法、DCC法、活性エステル法、ウッドワード試薬Kを用いる方法、カルボニルイミダゾール法、酸化還元法、DCC/HONB法、BOP試薬を用いる方法などにより、本発明のペプチドを得ることができる（例えば、Bodanszky, M and M .A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966)、Schroeder and Luebke, The Peptide, Academic Press, New York (1965)、F. M. Finn 及びK. Hofmann 著、The Proteins、第2巻、H.Nenrath、R. L. Hill 編集、Academic Press Inc., New York (1976)；泉屋信夫他著「ペプチド合成の基礎と実験」丸善(株) 1985年；矢島治明、榊原俊平他著、生化学実験講座1、日本生化学会編、東京化学同人 1977年；木村俊他著、続生化学実験講座2、日本生化学会編、東京化学同人 1987年などを参照）。また、自動ペプチド合成装置（PEアプライドバイオシステムズ社等）により化学合成することもできる。

【0012】

また、反応後は、公知の精製法により本発明のポリペプチドを精製単離することができる。例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のポリペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる本発明のペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0013】

(ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド)

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、本発明のポリペプチドをコードする塩基配列（DNAまたはRNA、好ましくはDNA）を含有するものであればいかなるものであってもよい。このようなポリヌクレオチドとしては、本発明のポリペプチドをコードするDNA、mRNA等のRNAが挙げられ、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖D

NA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（すなわち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（すなわち、非コード鎖）であってもよい。

【0014】

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明のポリペプチドのmRNAを定量することができる。

本発明のポリペプチドをコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

【0015】

本発明のポリペプチドをコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のペプチドをコードするDNAの塩基配列の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅する方法が挙げられる。また適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のポリペプチドの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別し本発明のポリペプチドをコードするDNAのクローニングを行ってもよい。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

【0016】

DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、MutanTM-

super Express Km (宝酒造 (株))、MutanTM-K (宝酒造 (株)) 等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel 法等の公知の方法あるいはそれらに準じた方法に従って行なうことができる。

クローン化されたポリペプチドをコードするDNAは、目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。このようなDNAは、その5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のポリペプチドの発現ベクターは、例えば、本発明のポリペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、そのDNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

【0017】

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例、pCR4、pCR2.1、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド (例、pSH19、pSH15)、 λ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。

【0018】

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMVプロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好

ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、*trp* プロモーター、*lac* プロモーター、*recA* プロモーター、 λ P_L プロモーター、*lpp* プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1 プロモーター、SPO2 プロモーター、*penP* プロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10 プロモーターなどが好ましい。

【0019】

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40 *ori* と略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、*dhfr* と略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、*Amp^r* と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、*Neor* と略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、CHO (*dhfr*⁻) 細胞を用いて *dhfr* 遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のポリペプチドのN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

【0020】

このようにして構築された本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

【0021】

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、

昆虫、動物細胞などが用いられる。

【0022】

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクレック・アシッズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440(1954)], DH5 α [Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H., Gene, 96, 23-28(1990)], DH10B [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 87巻, 4645-4649(1990)] などが用いられる。

【0023】

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・ズブチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

【0024】

酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D、20B-12、シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) などが用いられる。

【0025】

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中

腸由来のMG 1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞) などが用いられる。そのSf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

【0026】

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。

【0027】

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr-) 細胞と略記)、マウスL細胞, マウスAtT-20、マウスミエローマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などが用いられる。

【0028】

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

【0029】

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

【0030】

酵母を形質転換するには、例えば、メソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)

などに記載の方法に従って行なうことができる。

【0031】

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology) , 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

【0032】

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコル、263-267 (1995) (秀潤社発行)、ウイルス学 (Virology) , 52 巻, 456 (1973) に記載の方法に従って行なうことができる。

【0033】

このようにして、本発明のポリペプチドをコードする DNA を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

【0034】

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中にはその形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地の pH は約 5～8 が望ましい。

【0035】

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含む M9 培地 [ミラー (Miller) , ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics) , 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 β -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

【0036】

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行なって、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

【0037】

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

【0038】

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)] が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0039】

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195,788(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行なって、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0040】

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)], DMEM培地 [ウイルス学 (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・

ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオリジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)) などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行なって、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0041】

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のポリペプチドを生成させることができる。

【0042】

上記培養物から本発明のポリペプチドを分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のポリペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

【0043】

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるポリペプチドの精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

【0044】

このようにして得られるポリペプチドが遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

【0045】

なお、組換え体が産生するポリペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えることや、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

【0046】

このようにして生成する本発明のポリペプチドまたはその塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

【0047】

(機械刺激感受性チャネル阻害剤)

機械刺激感受性チャネル阻害剤としては、本発明のポリペプチド、もしくはそれらの塩のうちいずれか1つ以上（以下、「本発明のポリペプチド等」ともいう。）を含有するものが挙げられる。本発明のポリペプチド等は、機械刺激感受性チャネル阻害剤として使用できる。本発明のポリペプチド等は、取り扱いが容易であり、後の実施例で示されるように高い阻害活性を有する。

【0048】

(心房細動の治療剤)

心房細動の治療剤としては、本発明のポリペプチド、もしくはその塩のいずれか1つ以上を含有するものが挙げられる。

本発明のポリペプチドを含む心房細動の治療剤は、注射液などの形で非経口的に心房の血管等に投与するか、錠剤、カプセル剤など経口投与により使用できる。注射用製剤の場合は単位投与量アンプル又は多投与量容器の状態で提供されてもよい。また、ヒトのみならずヒト以外の哺乳動物に対しても投与することがで

きる。これら製剤化については、公知の製剤化方法を採用することができる。

【0049】

これらの各種製剤は、製剤上通常用いられる賦形剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、潤滑剤、界面活性剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、矯味矯臭剤、無痛化剤、安定化剤、等張化剤等などを適宜選択し、常法により製造することができる。上記各種製剤は、医薬的に許容される担体又は添加物を共に含むものであってもよい。このような担体及び添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトースなどが挙げられる。使用される添加物は、本発明の剤型に応じて上記の中から適宜又は組み合わせて選択される。

【0050】

上記のような剤型において、活性成分である本発明のポリペプチドは、剤型中例えば、0.01重量%～100重量%、好ましくは0.1重量%～90重量%、より好ましくは1重量%～50重量%含まれる。

【0051】

本発明のポリペプチドの投与量は、非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、心房細動患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を投与する。経口投与の場合、例えば、心房細動患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。

本発明の心房細動の治療剤は、好ましくは1日1回から数回に分けて1日以上投与される。

【0052】

(ファルマコフォアの同定)

なお、本発明のポリペプチを設計するに当り、クモ毒ペプチド (GsMTx-4) のどの部位が活性に必要な最小単位となるファーマコフォアであるのかを、立体構造に基づいて精度良く予測した。

ファルマコフォアの同定は、例えば以下のようにして行なうことができる。まず、立体構造既知の類縁ペプチドの立体構造を鋳型としたホモロジーモデリング法によるクモ毒ペプチドの精密な構造予測を行なう。その結果、得られた構造に基づいて、活性部位を改変したペプチドの機能解析を行い、医薬品設計のターゲットとなる部位の絞込みを行なう。また、GsMTx-4 のジスルフィド結合の部分をもミミックした設計を行い、安定な構造をもつペプチドをデザインする。GsMTx-4 は3つのジスルフィド結合を持つ比較的柔軟性の低い立体構造を有することが知られているため、一般的に結合に関与することが多い極性アミノ酸残基を含む環状ペプチドをいくつかデザインし、活性に必要なファーマコフォアの同定を行なう。

【0053】

(活性の測定)

本発明のペプチドの活性評価方法としては、公知の活性評価方法を用いることができるが、好ましくは実施例1に記載されたパッチクランプ法による単一チャネル電流記録法を用いることができる。

【0054】**【実施例】**

(実施例1)

実験例1：クモ毒ペプチド (GsMTx-4) 配列と一致度の高い構造既知の類縁ペプチドの検索

配列番号4で表されるGsMTx-4のアミノ酸配列と一致度の高い構造について、PDB (タンパク質立体構造データベース) からクモ毒を対象に検索した。この結果、GsMTx-4と相同性の高い10の候補が上がった。これら候補のマルチプルアライメントの結果を以下の図1に示す。

図1に示す配列の中から、システイン残基が一致していて、なおかつシステイン残基間の長さがほぼ等しく、挿入欠失のない(GsMtx4の方が1残基長い)1QK6(Huwentoxin-I:配列番号12)を鋳型として選択し、ホモロジーモデリング法によりファーマコフォアの絞込みを行った。

【0055】

実験例2:クモ毒ペプチド(GsMTx-4)の立体構造予測

鋳型ペプチド1QK6を用いてホモロジーモデリングを行った。まず、1QK6とGsMTx-4とのアラインメントを行った。その結果を図2に示す。

【0056】

次に、プログラムMODELLERを用いてモデル構造の構築を行った。構築したGsMTx-4の構造モデルと鋳型に用いたHuwentoxin-Iとの重ね合わせた結果を図3および図4に示す。図3は、Huwentoxin-IとGsMtx-4を重ね合わせたステレオ図である。図4は、Huwentoxin-IとGsMtx-4を重ね合わせたモデルのC α トレースを示す。図4中、薄い線は鋳型を表し、濃い線はGsMtx-4を表す。

【0057】

また、図5にはHuwentoxin-Iで活性中心と考えられるArg20近傍の様子を示す。図5中、薄い線はhuwentoxin-Iを表し、濃い線はGsMtx-4を表す。さらに、Huwentoxin-IとGsMTx-4の表面構造を比較した結果を図6に示す。図6(a)～図6(d)において、左がhuwentoxin-I、右がGsMtx-4を表す。図6(a)は、hydrophobic patchから見たもの(上の図とほぼ同じ向き)を表す。図6(b)は、x軸の周りに+90°回転したものを表す。図6(c)は、y軸の周りに+90°回転したものを表す。図6(d)は、y軸の周りに180°回転したものを表す。図6(b)から両ペプチドの分子の形状はかなり異なっていることがわかる。また解離性側鎖を持つ残基の分布も異なっており、特異性決定に関係していることが推測できる。

【0058】

また、Robert et.al, J. Biol. Chem. Vol37, pp3443-34450, 2002.(上記非特許文献3)に開示されたGsMTx-4のNMRによる溶液中の構造と、本実施例により求められたGsMTx-4の構造を比較すると、本発明において構築

したモデリング構造は、実際の G s M T x - 4 の構造を反映していると判断できる。

【0059】

実験例 3 : 活性ペプチドのデザインとファーマコフォアの同定

上述の G s M T x - 4 のモデリング構造に基づいてペプチド断片のおおよその設計方針を決定した。図 7 に、GsMtx-4 の構造およびデザインしたペプチドの構造を表す。G s M T x - 4 は、3 つのジスルフィド結合により、図 7 の配列構造式に示すように 4 つのループ部分から成っている。したがって、G s M T x - 4 のどのループ部分が阻害活性に寄与する部分であることを調べるために TVP001 から TVP005 の 5 つのペプチドをデザインした。これらのペプチドについては、ループを構成しない部位にあるシステインをアラニンに置換している。TVP001 (配列番号 14) はループ 1 と 2、TVP002 (配列番号 15) はループ 3 と 4、TVP003 (配列番号 1) はループ 2、TVP004 (配列番号 2) はループ 3、TVP005 (配列番号 3) はループ 2 と 3 から成っている。

【0060】

(デザインしたペプチドのバイオアッセイ)

ペプチドの活性評価には、最も信頼性の高いパッチクランプ法による単一チャネル電流記録法を用いた。アッセイの対象としては、心筋由来の Ca^{2+} 依存性 BigK チャネル (Kawakubo et. Am J Physiol, 276:H1827.1999) を用いた。このチャネルを、発現しているニワトリの心室筋、もしくはこのチャネルの cDNA を強制発現した CHO 細胞にセルアタッチトパッチクランプ法を適用した後、inside-out 引きちぎりパッチ膜 (excised patch) を形成し、膜電位固定下で単一チャネル電流を計測した。デザインした合成ペプチドは G s M T x - 4 と同様、細胞外からチャネルをブロックするものと想定し、予め記録用ガラスピペットの一定位置以上の空間に既知濃度のペプチドを充填して、拡散によりチャネルに到達させるバックフィル (back-fill) を用いて投与した。この手法では拡散開始後おおよそ 15-20 分でピペット内ペプチド濃度が平衡に達するので、20 分後の抑制率からペプチドの解離定数を推定できる。あるいは抑制の時間経過からペプチドの相対的抑制力を推定することもできる。ペプチドの正確な解離定数を求めるには、outside-out

tの引きちぎりパッチ膜を形成して単一チャネル電流を計測し、種々の濃度のペプチドによる抑制効果を解析して用量—抑制曲線を求めなければならないが、この方法は格段の技術を要すること、今回は種々のデザインした合成ペプチドの一次スクリーニングであることから、前述のinside-out引きちぎりパッチにバックフィルを組み合わせたアッセイ法を使って、ペプチドの抑制効果について、およそその見積もりを行った。ペプチドの濃度としては、GsMTx-4での結果を考慮して $10\mu\text{M}$ を用いた。評価量としては、チャネルの開確率(P_o 、パーセント表示)を用い、抑制の強さはコントロール（ペプチド投与前）を基準とした抑制率（パーセント）、あるいは抑制の時間経過で表現した。

【0061】

（アッセイ結果）

デザインした5種類の合成ペプチドのうち、TVP003、TVP004及びTVP005に阻害活性が認められた。図8は、TVP003の阻害活性検査結果を示す。図8（a）は、単一チャネル電流の計測結果を表す図である。図8（b）は、チャネルの開確立（ P_o ）を表す。図8に示すように、TVP003は8分後にはほぼ100%の抑制効果を示したことから、TVP003の解離定数は μM オーダーかそれ以下であると推定された。この値は、TVP003が、天然のクモ毒ペプチドGsMTx-4と同等かそれ以上の阻害活性を有することを示唆している。

【0062】

図9は、TVP004の阻害活性検査結果を示す図である。図9（a）は、単一チャネル電流の計測結果を表す。図9（b）は、チャネルの開確立（ P_o ）を表す。図9に示すようにTVP004は $10\mu\text{M}$ で8分後には約60%、16分後には95%の阻害活性を示し、比較的強い阻害活性を示した。

【0063】

図10は、TVP005の阻害活性検査結果を示す図である。図10（a）は、単一チャネル電流の計測結果を表す。図10（b）は、チャネルの開確立（ P_o ）を表す。図10に示すように、TVP005は、20分後に約60%の阻害効果を示したことから、その解離定数はおよそ $10\mu\text{M}$ 程度と推定された。

【0064】

【発明の効果】

本発明によれば、機械刺激感受性チャネルの活性を特異的に阻害する新規ポリペプチドを得ることができる。

【0065】

このような本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、そのポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、その組換えベクターで形質転換させた形質転換体を用いれば、本発明のポリペプチドを大量に生産できる。

【0066】

本発明のポリペプチド、または本発明のポリペプチドの塩を含有する機械刺激感受性チャネル阻害剤は、機械刺激感受性チャネルに関する試薬を製造する際に有効である。

【0067】

本発明のポリペプチド、または本発明のポリペプチドの含有する心房細動の治療剤は、心房細動を効果的に治療することができる。

【0068】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Pharmadesign, Inc.,

<120> Low Molecule Polypeptide for Active Channel Blocker

<130> P03-0030

<140>

<141>

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Polypeptide

<400> 1

Trp Lys Cys Asn Pro Asn Asp Asp Lys Cys

1

5

10

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Polypeptide

<400> 2

Cys Ala Arg Pro Lys Leu Lys Cys

1

5

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Polypeptide

<400> 3

Trp	Lys	Cys	Asn	Pro	Asn	Asp	Asp	Lys	Ala	Ala	Arg	Pro	Lys	Leu	Lys
1				5					10					15	

Cys

<210> 4

<211> 35

<212> PRT

<213> Grammostola spatulata

<400> 4

Gly	Cys	Leu	Glu	Phe	Trp	Trp	Lys	Cys	Asn	Pro	Asn	Asp	Asp	Lys	Cys
1					5					10				15	

Cys	Arg	Pro	Lys	Leu	Lys	Cys	Ser	Lys	Leu	Phe	Lys	Leu	Cys	Asn	Phe
				20					25					30	

Ser Ser Gly

35

<210> 5

<211> 42

<212> PRT

<213> Atrax robustus

<400> 5

Cys Ala Lys Lys Arg Asn Trp Cys Gly Lys Asn Glu Asp Cys Cys Cys

1

5

10

15

Pro Met Lys Cys Ile Tyr Ala Trp Tyr Asn Gln Gln Gly Ser Cys Gln

20

25

30

Thr Thr Ile Thr Gly Leu Phe Lys Lys Cys

35

40

<210> 6

<211> 42

<212> PRT

<213> Hadronyche versuta

<400> 6

Cys Ala Lys Lys Arg Asn Trp Cys Gly Lys Thr Glu Asp Cys Cys Cys

1

5

10

15

Pro Met Lys Cys Val Tyr Ala Trp Tyr Asn Glu Gln Gly Ser Cys Gln

20

25

30

Ser Thr Ile Ser Ala Leu Trp Lys Lys Cys

35

40

<210> 7

<211> 30

<212> PRT

<213> Heteropodidae veratoria

<400> 7

Asp Asp Cys Gly Lys Leu Phe Ser Gly Cys Asp Thr Asn Ala Asp Cys

1

5

10

15

Cys Glu Gly Tyr Val Cys Arg Leu Trp Cys Lys Leu Asp Trp

20

25

30

<210> 8

<211> 32

<212> PRT

<213> Selenocosmia huwena

<400> 8

Gly Cys Leu Gly Asp Lys Cys Asp Tyr Asn Asn Gly Cys Cys Ser Gly

1

5

10

15

Tyr Val Cys Ser Arg Thr Trp Lys Trp Cys Val Leu Ala Gly Pro Trp
20 25 30

<210> 9

<211> 37

<212> PRT

<213> Agelenopsis aperta

<400> 9

Ala Cys Val Gly Glu Asn Gln Gln Cys Ala Asp Trp Ala Gly Pro His
1 5 10 15

Cys Cys Asp Gly Tyr Tyr Cys Thr Cys Arg Tyr Phe Pro Lys Cys Ile
20 25 30

Cys Arg Asn Asn Asn
35

<210> 10

<211> 37

<212> PRT

<213> Agelenopsis aperta

<400> 10

Ala Cys Val Gly Glu Asn Gln Gln Cys Ala Asp Trp Ala Gly Pro His

1

5

10

15

Cys Cys Asp Gly Tyr Tyr Cys Thr Cys Arg Tyr Phe Pro Lys Cys Ile

20

25

30

Cys Arg Asn Asn Asn

35

<210> 11

<211> 37

<212> PRT

<213> Agelenopsis aperta

<220>

<221> UNSURE

<222> (37)

<223> Xaa represents unknown amino acid residue

<400> 11

Glu Cys Val Pro Glu Asn Gly His Cys Arg Asp Trp Tyr Asp Glu Cys

1

5

10

15

Cys Glu Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Gln Pro Pro Lys Cys Ile Cys

20

25

30

Arg Asn Asn Asn Xaa

35

<210> 12

<211> 33

<212> PRT

<213> Selenocosmia huwena

<400> 12

Ala Cys Lys Gly Val Phe Asp Ala Cys Thr Pro Gly Lys Asn Glu Cys

1 5 10 15

Cys Pro Asn Arg Val Cys Ser Asp Lys His Lys Trp Cys Lys Trp Lys

20 25 30

Leu

<210> 13

<211> 37

<212> PRT

<213> Selenocosmia huwena

<400> 13

Leu Phe Glu Cys Ser Phe Ser Cys Glu Ile Glu Lys Glu Gly Asp Lys

1 5 10 15

Pro Cys Lys Lys Lys Lys Cys Lys Gly Gly Trp Lys Cys Lys Phe Asn

20

25

30

Met Cys Val Lys Val

35

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Polypeptide

<400> 14

Gly Cys Leu Glu Phe Trp Trp Lys Ala Asn Pro Asn Asp Asp Lys Ala

1

5

10

15

Cys

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Polypeptide

<400> 15

Cys Ala Arg Pro Lys Leu Lys Ala Ser Lys Leu Phe Lys Leu Cys
1 5 10 15

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、GsMTx-4 と相同性の高い 10 の候補マルチプルアライメントの結果を示す図である。

【図 2】 図 2 は、1QK6 と GsMTx-4 とのアラインメントの結果を示す。

【図 3】 図 3 は、Huwentoxin-I と GsMTx-4 を重ね合わせたステレオ図である。

【図 4】 図 4 は、Huwentoxin-I と GsMTx-4 を重ね合わせたモデルの C α トレースを示す。図 4 中、薄い線は鑄型を表し、濃い線は GsMTx-4 を表す。

【図 5】 図 5 は、Huwentoxin-I で活性中心と考えられる Arg20 近傍を表す図である。図 5 中、薄い線は huwentoxin-I を表し、濃い線は GsMTx-4 を表す。

【図 6】 図 6 (a) ~ 図 6 (d) は、Huwentoxin-I (PDB code: 1QK6) を鑄型としたモデルの表面構造を表す図である。図 6 (a) ~ 図 6 (d) において、左が huwentoxin-I、右が GsMTx-4 を表す。図 6 (a) は、hydrophobic patch から見たもの（上の図とほぼ同じ向き）を表す。図 6 (b) は、x 軸の周りに +90° 回転したものを表す。図 6 (c) は、y 軸の周りに +90° 回転したものを表す。図 6 (d) は、y 軸の周りに 180° 回転したものを表す。

【図 7】 図 7 は、GsMTx-4 の構造およびデザインしたペプチドの構造を表す。

【図 8】 図 8 は、TVP003 の阻害活性検査結果を示す図である。図 8 (a) は、単一チャネル電流の計測結果を表す。図 8 (b) は、チャネルの開確立 (P_o) を表す。

【図 9】 図 9 は、TVP004 の阻害活性検査結果を示す図である。図 9 (a) は、単一チャンネル電流の計測結果を表す。図 9 (b) は、チャンネルの開確立 (P o) を表す。

【図 10】 図 10 は、TVP005 の阻害活性検査結果を示す図である。図 10 (a) は、単一チャンネル電流の計測結果を表す。図 10 (b) は、チャンネルの開確立 (P o) を表す。

【書類名】 図面

【圖 1】

1QDP__	—CAKRNWCG—KNEDECCP—MKCIYAWYNQGGSCQTITGLFKKC	配列番号5
1VTX__	—CAKRNWCG—KTEDCCGP—MKGVYAWYNEQGGSCQSTISALWKKC	配列番号6
1EMX_A	—DDCGKLFSGED—TNADCCGG—YVGR—LWCK—LD—W—	配列番号7
1QK7_A	—GC—LGDKED—YNNGCCSG—YVGSRTW—KWCV—LAGPW—	配列番号8
1BITU__	—AGVGENQQCADW—AGPHCCDG—YYGTORYF—PKCIGRMNN—	配列番号9
1BITV__	—AGVGENQQCADW—AGPHCCDG—YYGTORYF—PKCIGRMNN—	配列番号10
1BIT__	—EGVPENGHCROW—YD—EGGEG—FYSSCRQP—PKCIGRMNNX—	配列番号11
1QK6_A	—ACKGVFDACTP—GKNECCPN—RVCSDKH—KWCKWKL—	配列番号12
GSMTX4	—GLEPWWKGNP—NDDKCCRP—PKLKCSKLP—KLQNFSSG—	配列番号4
1I25_A	—LFECS—FSCEIEKEGDKPK—KAK—KKCKGGW—KKCFMVCVKV—	配列番号13

【図 2】

1QK6 と G s M T x-4 とのアライメント

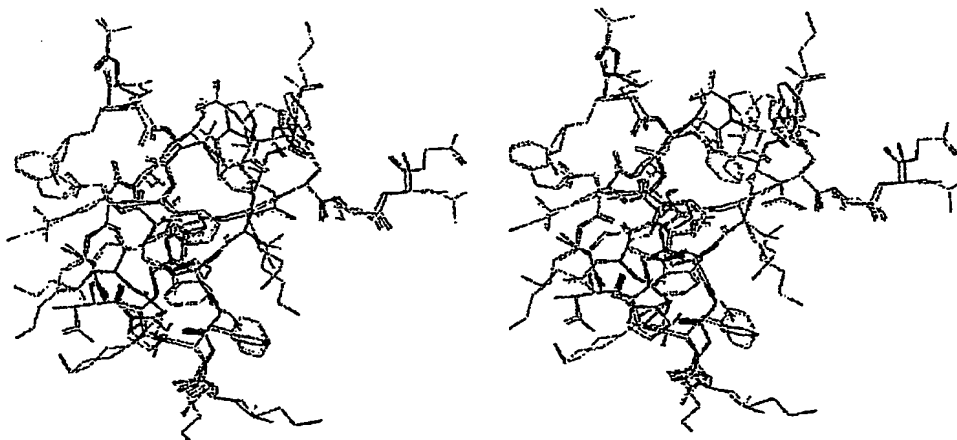
1QK6 ACKGVFDACTPGKNECC-PN¹WVCSDKHKWCKWKL- 配列番号 1 2

GSMTX4 GCLEFWWKCNPNDKCCRPKLKCSKLFKLCNFSSG 配列番号 4

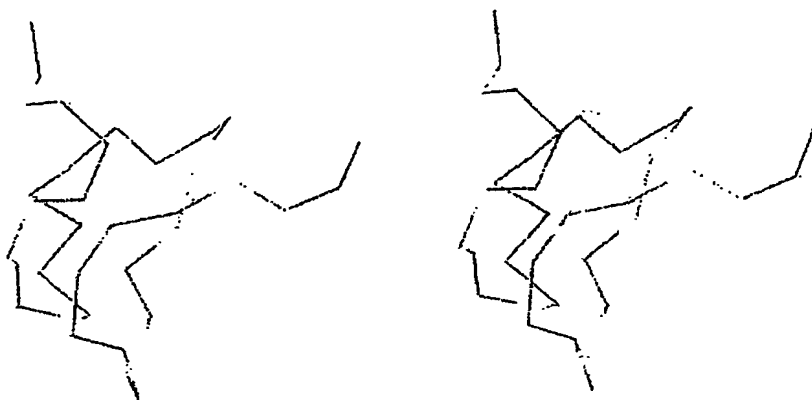
. * . : * . * . : * * * : * * . * * : . % identity: 30.3

(アライメント: Clustalw 1.81)

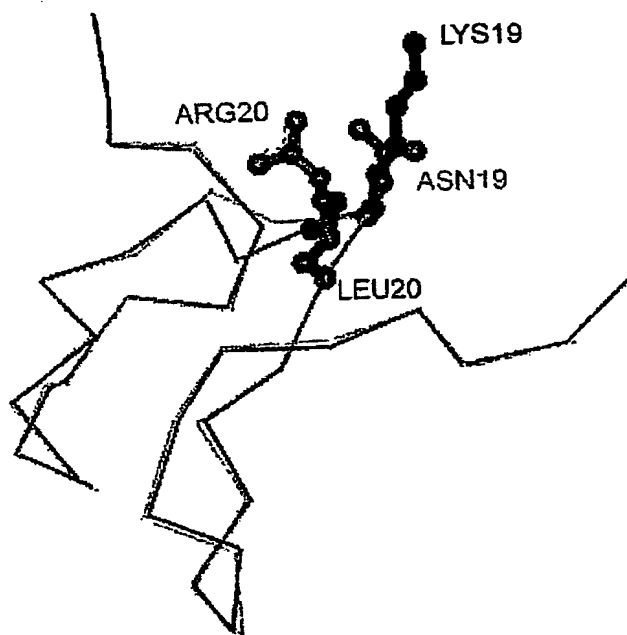
【図 3】



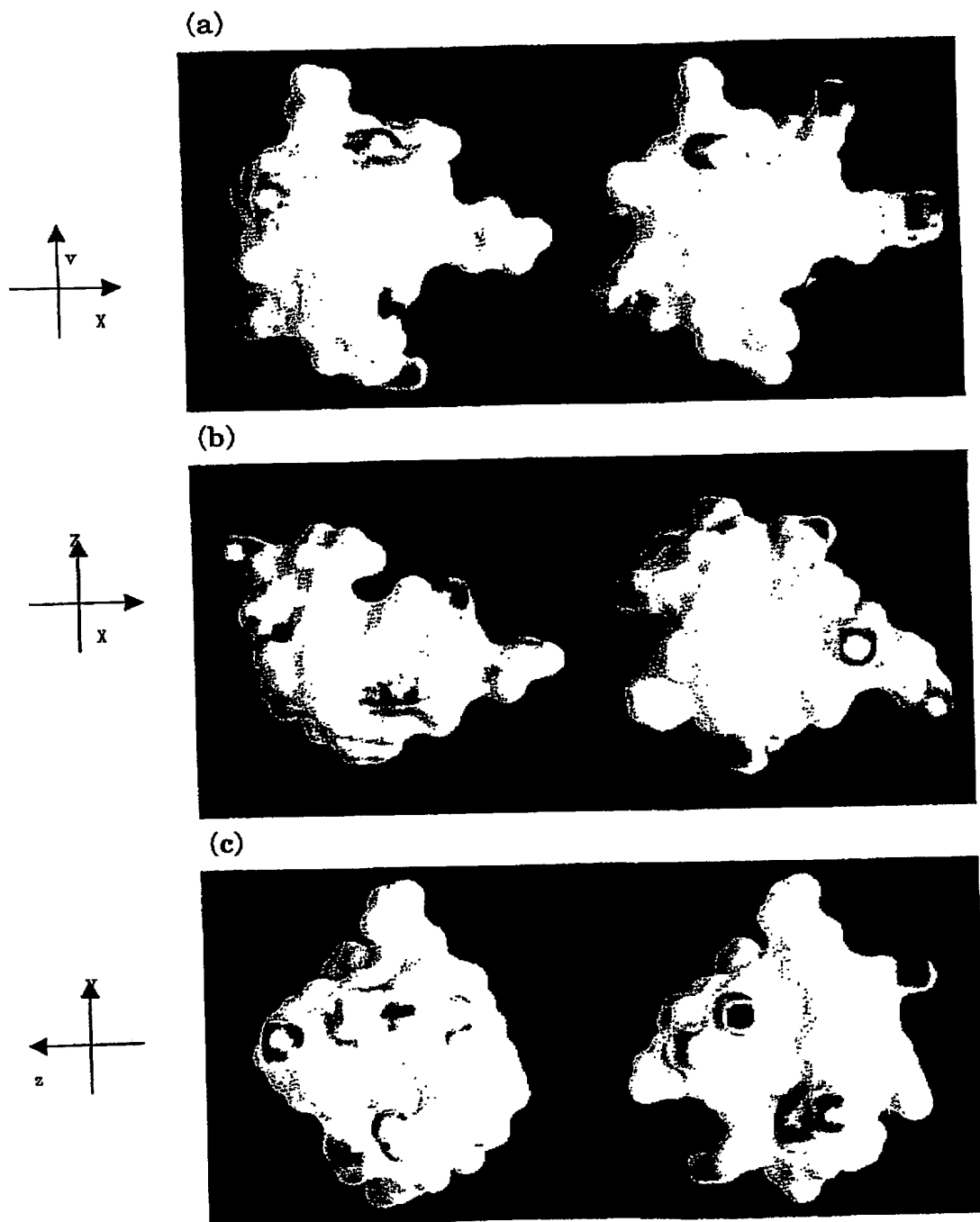
【図 4】



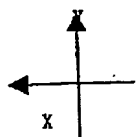
【図 5】



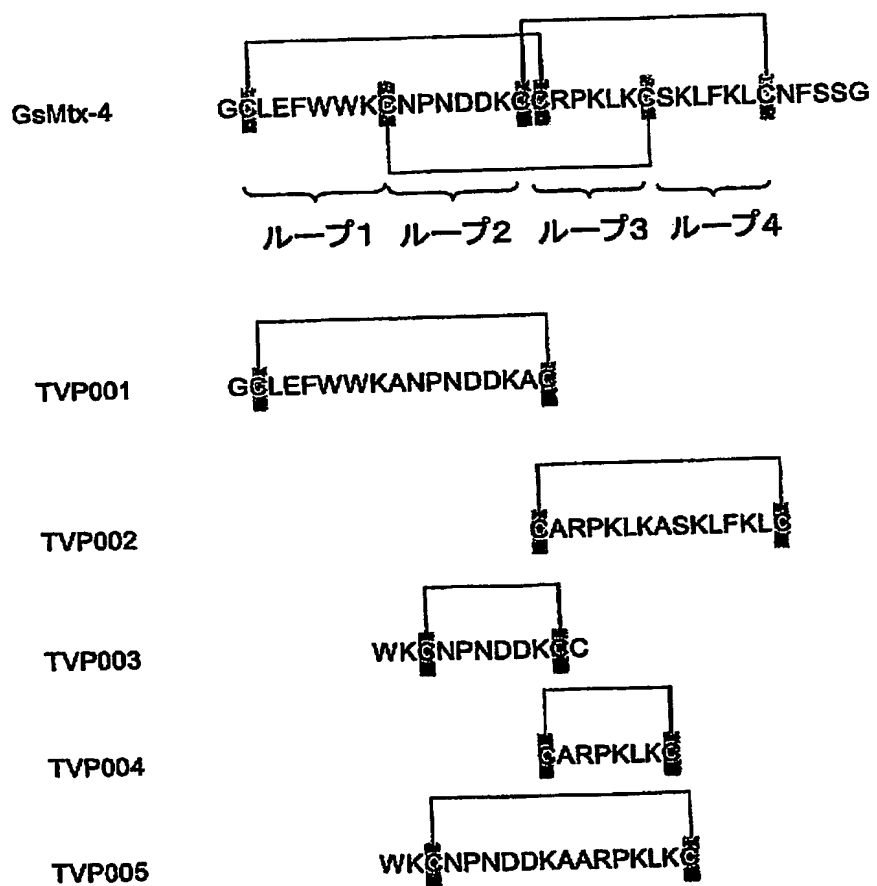
【図 6】



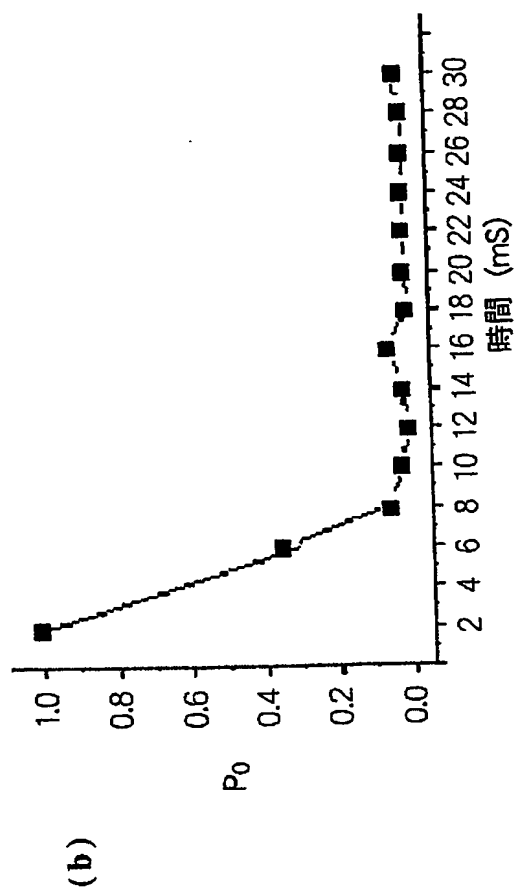
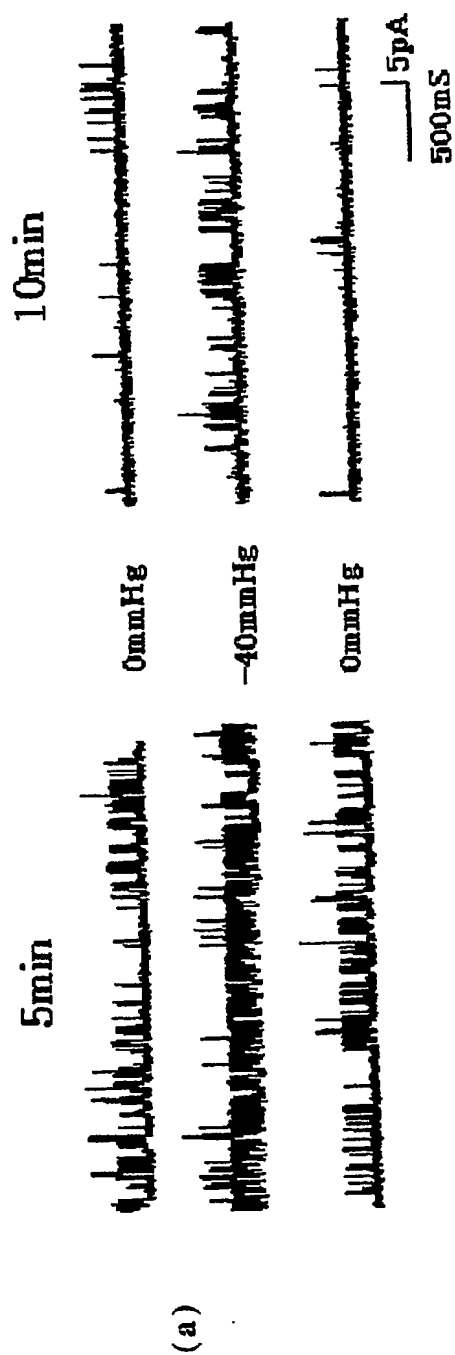
(d)



【図 7】

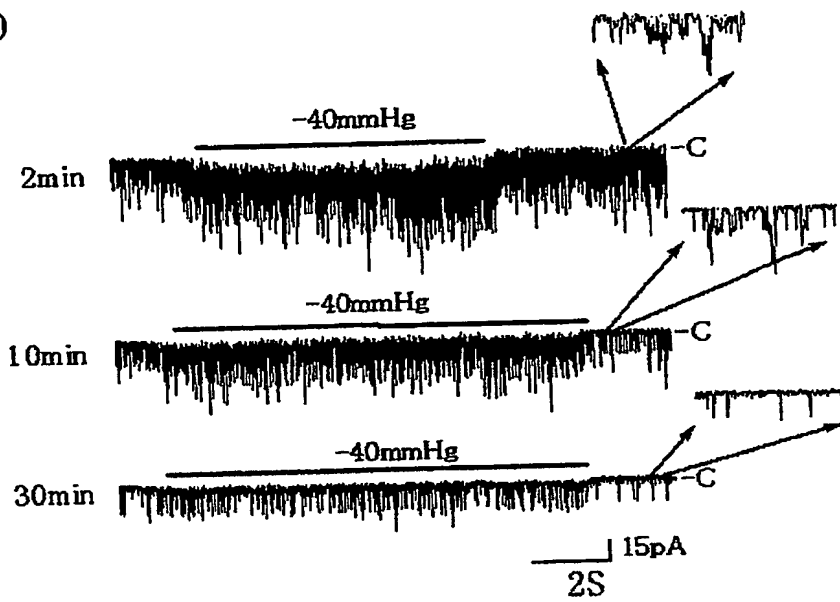


【図 8】

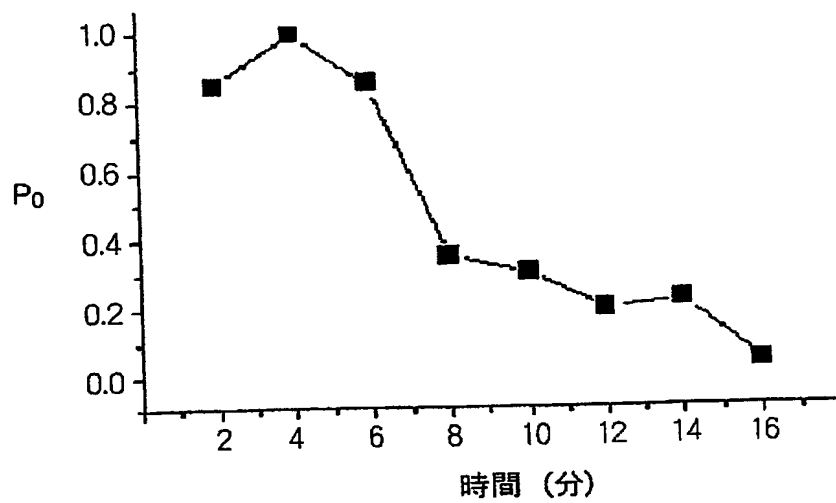


【図 9】

(a)

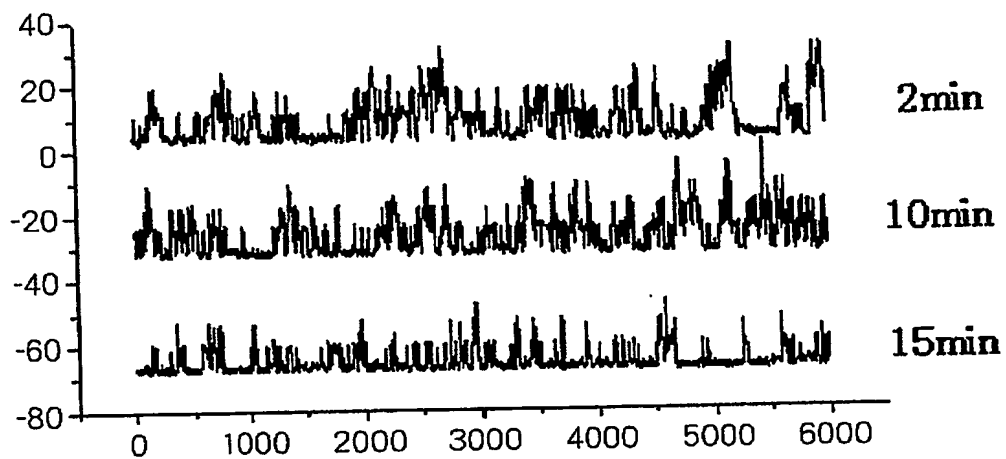


(b)

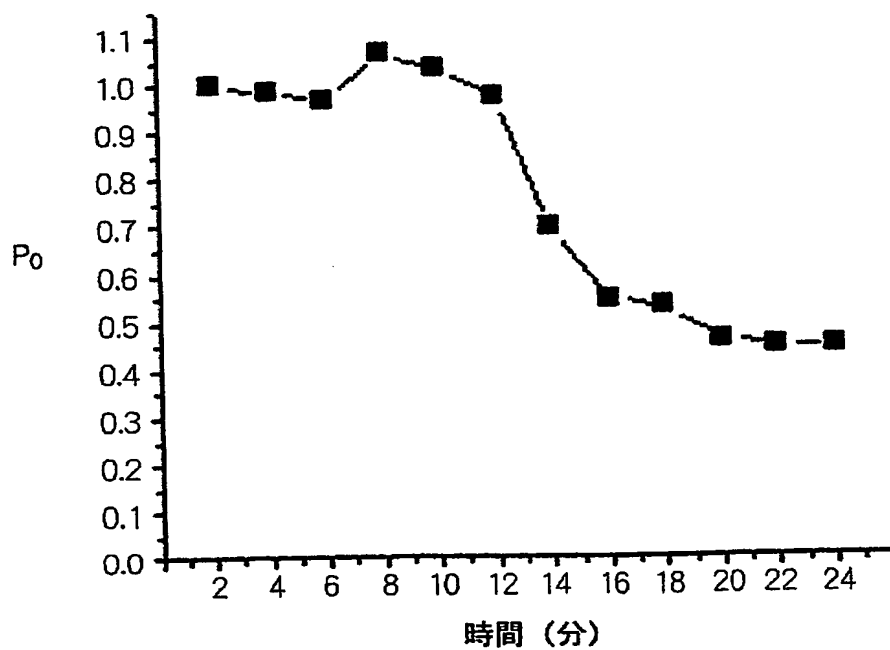


【図 10】

(a)



(b)



【書類名】 要約書

【課題】 機械刺激感受性チャネルの活性を特異的に阻害する新規ポリペプチド、このようなポリペプチド、またはその塩を含有する機械刺激感受性チャネル阻害剤、心房細動の治療薬を提供する。

【解決手段】 配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、または当該ポリペプチドの塩や、これらを含有する機械刺激感受性チャネル阻害剤、心房細動の治療薬など。

【選択図】 図 7

【書類名】 手続補正書
【整理番号】 P03-0030
【提出日】 平成15年 4月 2日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2003- 85666
【補正をする者】
 【識別番号】 500386563
 【氏名又は名称】 株式会社ファルマデザイン
【代理人】
 【識別番号】 100092783
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 小林 浩
 【電話番号】 03-3273-2611

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 発明者

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区八丁堀 4-2-10 第二後関ビル 株式会社ファルマデザイン内

【氏名】 横田川 高峰

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町 65 名古屋大学大学院医学系研究科 細胞生物物理学教室内

【氏名】 曾我部 正博

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区八丁堀 4-2-10 第二後関ビル 株式会社ファルマデザイン内

【氏名】 古谷 利夫

【その他】 出願の際、発明者の記載に誤記がありましたので訂正致します。

【ブルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-085666
受付番号	50300549133
書類名	手続補正書
担当官	関 浩次 7475
作成日	平成15年 4月14日

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】

【識別番号】

500386563

【住所又は居所】

東京都中央区八丁堀 4-2-10 第二後関ビル
3F

【氏名又は名称】

株式会社ファルマデザイン

【代理人】

申請人

【識別番号】

100092783

【住所又は居所】

東京都中央区八重洲二丁目 8 番 7 号 福岡ビル 9
階 阿部・井窪・片山法律事務所

【氏名又は名称】

小林 浩

次頁無

特願 2 0 0 3 - 0 8 5 6 6 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 0 3 8 6 5 6 3]

1. 変更年月日

2 0 0 0 年 8 月 1 5 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区八丁堀 4 - 2 - 1 0 第二後関ビル 3 F

氏 名

株式会社ファルマデザイン

2. 変更年月日

2 0 0 3 年 4 月 2 3 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区八丁堀 2 丁目 1 9 番 8 号 長谷工八丁堀ビル 5 階

氏 名

株式会社ファルマデザイン